

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E.A.P. DE MEDICINA VETERINARIA

**Detección de anticuerpos contra el virus de la
enfermedad de aujeszky en porcinos de crianza semi-
tecnificada de Lima Metropolitana**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Ana Fiorella Castillo Espinoza

Lima – Perú

2014



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
Facultad de Medicina Veterinaria
ESCUELA ACADÉMICO-PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA

Trabajo sustentado y aprobado ante el Jurado designado por la Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria mediante Resolución Directoral N° 205-EAPMV/FMV-2014

PRESIDENTE :

SONIA CALLE ESPINOZA

MIEMBROS :

HERMELINDA RIVERA GERÓNIMO
Asesora de la Tesis

ANTONIO AMPUERO BUSTILLO

ALBERTO MANCHEGO SAYÁN

San Borja, 27 de noviembre de 2014

Vº Bº

MV. DIEGO DÍAZ COAHILA
Director de la Escuela Académico Profesional de
Medicina Veterinaria





UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMERICA)
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
ESCUELA ACADEMICO-PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO

En el auditorio principal de la Facultad de Medicina Veterinaria, el día jueves **27 de noviembre de 2014**, a las **12:00** horas, se constituyó el Jurado Examinador designado mediante Resolución Directoral N° **205-EAPMV/FMV-2014**, integrado por los siguientes profesores:

SONIA CALLE ESPINOZA	Presidente del Jurado
HERMELINDA RIVERA GERÓNIMO	Asesora de la Tesis
ANTONIO AMPUERO BUSTILLO	Miembro del Jurado
ALBERTO MANCHEGO SAYÁN	Miembro del Jurado

Luego de la instalación del Jurado, a cargo del Presidente del Jurado y bajo la dirección del mismo, la Bachiller Doña: **CASTILLO ESPINOZA, ANA FIORELLA**, para optar el Título Profesional de Médico Veterinario, procedió a sustentar públicamente la Tesis:

“DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA EL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE AUJESZKY EN PORCINOS DE CRIANZA SEMI-TECNIFICADA DE LIMA METROPOLITANA”

Luego de absolver las preguntas del Jurado y del público asistente, el Jurado deliberó con la abstención reglamentaria del Asesor de la Tesis y acordó su **APROBACIÓN** por **UNANIMIDAD**, otorgándole la nota de **DIECIOCHO (18)**.

Habiéndose aprobado la sustentación pública de la Tesis, el Presidente en representación del Jurado recomienda que la Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria proponga la aprobación del **TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO** a la Facultad de Medicina Veterinaria y que ésta proponga al Rectorado el otorgamiento respectivo.

Siendo las **13:00 horas**, concluyó el acto académico de sustentación pública de Tesis en fe de lo cual suscriben la presente acta por cuadruplicado los integrantes del Jurado:


Sonia Calle Espinoza: Mg. Prof. Principal, D.E.


Hermelinda Rivera Gerónimo: Mg. Prof. Principal, D.E.


Antonio Ampuero Bustillo: MV. Prof. Asociado, D.E.


Alberto Manchego Sayán: Mg. Prof. Principal, D.E.



DEDICATORIA

A mi mamá, Ana, quien me ha dado la vida y es por quien vivo; porque nosé que sería de mi sin ella, por su amor eterno, comprensión, dedicación y palabras que llenan mis días de motivos, por sus gestos. Gracias por existir.

A mi papá, Roger, porque es un ejemplo de fortaleza, nobleza e inteligencia, todo en su máxima expresión; por que nos transporta a otro mundo con sus palabras, por ser una persona extraordinaria, porque en los momentos más difíciles nunca se doblegó y por permitirme ser su hija.

A mi hermano Vladimir, porque la palabra inteligencia queda corta como adjetivo para calificarlo, porque me permite enfocar la vida de manera diferente, porque no existen intermedios para él, por su capacidad sobrenatural para convencer con una palabra, por su conocimiento infinito para muchos pero insuficiente para él, porque me motiva a ser cada día una mejor persona; por ser el incomprendido a quien más amo.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora, Doctora Hermelinda Rivera por ser un ejemplo a seguir, por su apoyo incondicional, paciencia infinita y por la oportunidad que me brinda día a día para crecer personal y profesionalmente, por ser como una segunda madre para mi, por hacerme sentir valiosa y permitirme que el laboratorio se convierta en mi casa, muchas gracias mi querida doctora.

A la Doctora Mercy Ramírez, por las enseñanzas que me brinda, por ser consecuente en sus pensamientos, por su paciencia y gran apoyo durante la realización de mi tesis, por ser algo más que mi guía.

A mis amigos, tesisistas y compañeros de trabajo, miembros de la Sección de Virología que entre bromas me permiten crecer profesionalmente; espero conservar siempre su invaluable amistad.

INDICE

	Pág
RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE ABREVIATURAS	iii
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS	iv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Agente etiológico	3
2.1.1. Estructura del virus de la Enfermedad de Aujeszky	4
2.1.1.1. El núcleo central	5
• <i>Genoma viral:</i>	
2.1.1.2. La cápside	5
2.1.1.3. El tegumento	5
2.1.1.4. La envoltura	6
2.1.2. Replicación viral	7
2.1.2.1. El ingreso del virus a la célula	7
2.1.2.2. La liberación y transcripción del ADN en el núcleo	7
<i>a) Transcripción de los genes inmediatamente tempranos (IE)</i>	7
<i>b) Transcripción de los genes tempranos (E)</i>	7
• La replicación del ADN viral	
<i>c) Transcripción de los genes tardíos</i>	8
2.1.2.3. El ensamblaje	9

2.1.2.4.	Formación de la Envoltura y Egreso de la Partícula viral	9
2.1.3.	Factores de virulencia	9
2.2.	Patogenia	11
2.3.	Signos clínicos	13
•	Edad del animal y estado inmunológico	13
•	Virulencia de la cepa	13
2.3.1.	Forma nerviosa	14
2.3.2.	Forma respiratoria	14
2.3.3.	Forma reproductiva	15
2.4.	Mecanismo de persistencia viral – Latencia	16
2.4.1.	Bases moleculares de la latencia	16
2.4.2.	Etapas del ciclo latencia-reactivación	17
2.4.2.1.	Establecimiento de la latencia	17
2.4.2.2.	Mantenimiento de la latencia	17
2.4.2.3.	Reactivación de la latencia	17
2.5.	Epidemiología	18
2.6.	Lesiones Macro y Microscópicas	19
2.7.	Respuesta inmunitaria	20
2.8.	Dinámica de la infección	23
2.9.	Diagnóstico	23
2.9.1.	Aislamiento viral	24
2.9.2.	Detección de antígeno viral	24
2.9.3.	Detección de ácido nucleico	25
2.9.4.	Detección de anticuerpos	25

2.9.4.1.	Prueba de Aglutinación en Látex	25
2.9.4.2.	ELISA	26
2.9.4.3.	Virus neutralización	26
III.	MATERIALES Y METODOS	
3.1.	Obtención de las muestras de suero porcino	28
3.2.	Materiales	30
3.2.1.	Equipos del Laboratorio	
3.2.2.	Reactivos y materiales de diagnóstico	
3.3.	Metodología	30
3.3.1.	Prueba de Virus Neutralización	30
3.3.2.	Procedimiento	31
3.3.3.	Lectura	31
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
V.	CONCLUSIONES	35
VI.	LITERATURA CITADA	36

RESUMEN

Estudios preliminares realizados en la década del 90 indican que el virus causante de la enfermedad de Aujeszky está presente en porcinos de crianza no tecnificada pero ausente en granjas tecnificadas. Estos resultados sugieren que los porcinos de crianza semitecnificada y/o no tecnificada pueden ser nichos o fuentes del virus de Aujeszky, constituyendo un riesgo para las granjas tecnificadas. El objetivo del presente estudio es detectar anticuerpos contra el virus de la enfermedad de Aujeszky (EA) en porcinos de crianzas semi-tecnificadas de los alrededores de Lima metropolitana. Se colectaron 463 muestras de suero porcino entre machos y hembras de 130 a más días de edad, aparentemente normales, procedentes de criaderos semi-tecnificados de los distritos de Villa el Salvador (n=100), Huachipa (n=59), Pamplona (n=48), Lurín (n=41), Ventanilla (n=41), San Juan de Lurigancho (n=34), Villa María del Triunfo (n=31), San Juan de Miraflores (n=27), La Molina (n=19), Chosica (n=16), San Bartolo (n=14), Carabayllo (n=14), Chorrillos (n=12) y Chilca (n=07), durante el beneficio en un matadero de la ciudad de Lima con el fin de detectar los anticuerpos neutralizantes contra el virus de la EA mediante la prueba de neutralización viral. El 100% de las muestras resultaron negativos a anticuerpos contra el virus de la EA. Se concluye que la ausencia de seropositividad al virus de la EA en los porcinos muestreados podría deberse a la tendencia hacia la mejora en el manejo productivo y sanitario que han asumido los criadores de los centros de crianza semi-tecnificados estudiados.

Palabras clave: porcino, crianza semi-tecnificada, virus de la enfermedad de Aujeszky, anticuerpos, neutralización viral

ABSTRACT

Preliminary studies in the 90s indicate that the virus of Aujeszky's disease is present in non-tech breeding pigs but absent in technologically advanced farms. These results suggest that pig breeding semi-enteched and / or can not be tech niches or sources Aujeszky virus, constituting a risk for technologically advanced farms. The aim of this study is to detect antibodies against the virus of Aujeszky's disease (AD) in swine breeds semi-enteched surrounding metropolitan Lima. 463 pig serum samples were collected between males and females over 130 days old, apparently normal, from semi-enteched breeding districts of Villa El Salvador (n = 100), Huachipa (n = 59), Pamplona (n = 48), Lurin (n = 41), contact (n = 41), San Juan (n = 34), Villa Maria del Triunfo (n = 31), San Juan de Miraflores (n = 27), the Molina (n = 19), Chosica (n = 16), San Bartolo (n = 14), Carabayllo (n = 14), Chorrillos (n = 12) and Chilca (n = 07), during the benefit in a slaughterhouse in Lima detect neutralizing antibodies against the virus of AD by testing viral neutralization. 100% of the samples were negative for antibodies against the virus of AD. We conclude that the absence of virus seropositivity in sampled AD pigs could be due to the trend towards improvement in the production and health management that breeders have assumed in semi-enteched breeding centers in this study.

Keywords: swine, semi-tech breeding, virus Aujeszky's disease, antibodies, viral neutralization

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxirribonucleico
ADV	Virus de la Enfermedad de Aujeszky
ARN	Ácido ribonucleico
CNB	Cornete nasal Bovino
IFN	Interferón
LAT _s	Sitios de transcripción asociados a latencia
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PRV	Pseudorrabia
U _L	Región única larga
U _s	Región única corta
VHP-1	Herpesvirus porcino tipo 1
VN	Virus Neutralización

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Figura 1. Estructura del ADV. (Pág. 6)

Figura 2. Replicación del ADV. (Pág. 10)

Cuadro 1.- Procedencia y número de muestras de sangre porcina obtenidos por distrito y punto cardinal. (Pág. 29)

I. INTRODUCCIÓN

De acuerdo a lo indicado por el MINAG la población porcina estimada sería superior a los 3 millones en el año 2010. El 51,1% (1'135,800) del total de la población porcina se concentra en la Sierra por lo que los cerdos criollos representan el 67, 2% y los cerdos de razas definidas presentes, principalmente en la costa, el 32,8% (INEI, 2012). Así mismo, de un total de 1939,446 porcinos en crianza de familiar y/o de traspatio, Lima posee un 17% (SENASA, 2010).

De acuerdo a la tecnología que se utiliza, la crianza porcina puede ser clasificada en: crianza de tipo familiar o de traspatio que constituye hasta un 80%, en donde los animales son criados sin tecnología y sin control sanitario; crianza semi-tecnificada, que hace uso tecnología moderna pero también algunas técnicas tradicionales; y la crianza tecnificada que es un sistema de producción intensivo con manejo de parámetros reproductivos, control genético y sanitario, alta bioseguridad, etc (Landín-FAO, 2007).

Sin embargo, como en todo sistema de crianza, las enfermedades infecciosas constituyen serias amenazas a la producción y reproducción porcina. Se conoce que la enfermedad es de gran impacto económico en el mundo, pero aun no se conoce a ciencia cierta el impacto que podría tener en el país debido a que los estudios recientes son escasos.

La enfermedad de Aujeszky (EA) o Pseudorabia (PRV), es una enfermedad de origen viral que afecta al porcino y otras especies de animales como el bovino, canino, felino, equino, etc. La enfermedad es causante de pérdidas económicas a la industria porcina mundial porque

afecta a los sistemas nervioso sobre todo en lechones, respiratorio y reproductivo y por ser restrictiva para el comercio internacional del porcino (Muller *et al.*, 2011). El cerdo es el reservorio del virus; la estrategia de persistencia del virus de la enfermedad de Aujeszky (ADV) en la población de porcinos es mediante la latencia en SNC, sistema hematopoyético y tejidos linfoides. Al mantenerse latente en los ganglios neuronales, puede ser reactivado y diseminado en respuesta a varios estímulos como el estrés; esta capacidad del virus de persistir en estado de latencia hace más difícil su erradicación de granjas porcinas infectadas (Mettenleiter, 2000; King *et al.*, 2012).

En el país no existe información documentada de la presencia de casos clínicos de la EA, sin embargo, serológicamente, anticuerpos y antígenos del VHP-1 han sido detectados en porcinos de crianza no tecnificada; más no así en porcinos de granjas tecnificadas (Manchego *et al.*, 1998; Cerón, 1997; Salas, 1997), indicando que la infección está asociada al sistema de crianza, por tanto, son las escasas condiciones zoosanitarias y el estrés permanente, los factores que propician la difusión del virus, incrementando la susceptibilidad de los animales, principalmente jóvenes, a otras infecciones (Manchego *et al.*, 1998). El SENASA realizó un estudio recientemente acerca de la presencia de ADV en los distintos departamentos del país. Encontrando animales positivos al ADV en los departamentos de Pasco (12,12%) y Piura (10,71%), mas no en los otros departamentos del país incluyendo Lima. Ante la ausencia de datos actuales sobre la presencia de la EA en animales de crianza semi-tecnificada, se realizó el presente estudio con el objetivo de detectar la presencia de anticuerpos contra el virus de la EA en porcinos de crianza semi-tecnificada ubicados en parques porcinos de Lima dentro del contexto de vigilancia de una enfermedad.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.10. Agente etiológico:

La enfermedad de Aujeszky es causado por el virus de la enfermedad de Aujeszky o el Virus Herpes Porcino tipo 1 (VHP-1). El VHP-1 posee genoma ADN de doble hebra ampliamente distribuida en los vertebrados. La clasificación taxonómica de los virus herpes ha sido recientemente actualizada acuerdo al noveno reporte del Comité Internacional de Taxonomía de virus (Davison *et al.*, 2009; ICTV, 2012). De acuerdo a este comité los virus herpes se clasifican en Orden Herpesvirales, familias: *Herpesviridae*, *Alloherpesviridae* y *Malacoherpesviridae* (ICTV, 2012)

La familia *Herpesviridae* comprende a su vez tres subfamilias, basadas en sus propiedades biológicas, contenido y organización del genoma: *Alfaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* y *Gammaherpesvirinae* (ICTV, 2012).

Los miembros de la subfamilia *Alfaherpesvirinae* poseen un amplio rango de hospederos, son virus altamente citolíticos y establecen latencia en los ganglios sensorios. Basado en un criterio molecular y análisis de secuenciamiento, la subfamilia *Alfaherpesvirinae*, ha sido subdividida en cuatro géneros:

- El género *Simplexvirus* que involucra al virus herpes tipo 1 y 2 (HSV-1 HSV-2) que afectan al hombre, herpes bovino 2, herpes ateline.

- Género *Varicellovirus* que involucra al virus de la Varicela Zoster (VZV), virus herpes bovino tipo 1 (BHV-1) también conocido como IBR, herpes bovino 5, herpes caprino tipo 1, herpes equino tipo 1 (EHV-1), herpes equino tipo 3 (EHV-3), herpes equino tipo 4 (EHV-4) o Rinoneumonitis equina, herpes felino tipo 1 (FHV-1), herpes canino (CHV-1), herpes aviar tipo 1 o virus de la Laringotraqueítis infecciosa (ILTV) y **el virus herpesporcino tipo 1 (ADV o PRV)**.
- Género *Mardivirus* involucra al virus herpes tipo 1 y 2 de la Enfermedad de Marek y al virus herpes tipo 1 del pavo, herpes 1 de la paloma.
- Género *Iltovirus* que comprende al virus de la Laringotraqueítis aviar y al virus herpes psitacide (ICTV, 2012).

Los miembros de la subfamilia *Betaherpesvirinae* poseen un rango de hospederos más restringido y la replicación es más lenta. Hacen latencia en células de la serie de los monocitos; en glándulas secretorias, tejido linforeticual y riñones. Los miembros de la subfamilia *Gamaherpesvirinae* se caracterizan por su replicación en células linfoblastoides, son específicos para los linfocitos B y T y hacen latencia en linfocitos. (Davison *et al.*, 2009; ICTV, 2012)

2.10.1. Estructura del virus de la Enfermedad de Aujeszky

La clasificación del ADV dentro de la familia *Herpesviridae* se debe históricamente a su arquitectura única, y a la semejanza del virión con los otros miembros de la familia.

El virión maduro, es una partícula casi redonda de 150 a 180 nm; constituido por un núcleo central rodeado por tres capas. El núcleo contiene una molécula de ADN de doble cadena lineal, le sigue su cápside de simetría icosaédrica que a su vez se continúa con el tegumento que finalmente está protegido por la envoltura (Nauwynck, 1997; Fenner, 2011; ICTV, 2012). Por tanto, desde un punto de vista morfológico consta de cuatro componentes: El núcleo central, la cápside, el tegumento y la envoltura (Pomeranz *et al.*, 2005).

2.10.1.1. El núcleo central

El núcleo central contiene el genoma del ADN del virus. Aún se conservan 40 genes del virus aproximadamente entre los miembros de la familia *Herpesviridae*; estos genes son los que codifican proteínas que participan activamente en la replicación de los virus del herpes, debido a su estructura común, y semejanza en los requisitos para su replicación (Pomeranz *et al.*, 2005).

- *Genoma viral:*

El genoma del ADV consiste en un ADN de cadena doble lineal de aproximadamente 150 kbp que contiene la información genética del virión (Mettenleiter, 2000). El genoma presentados únicas regiones, la región larga única (U_L) y la región corta única (U_S), flanqueada por dos secuencias repetidas, una interna (IRS) y una terminal (TRS) (Nauwynck *et al.*, 2007).

Los diferentes genes que conforman el genoma de los alfa herpesvirus son designados por el código de lectura U_L o U_S dependiendo de la ubicación en la U_L o U_S, seguido de un número; el número indica el paso de los genes en la región específica (Nauwynck *et al.*, 2007).

El genoma codifica 16 proteínas asociadas a la envoltura, de las cuales 11 son glicoproteínas designadas por letras: gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gK, gL, gM y gN; de éstas, todas excepto la gG se encuentra presente en la envoltura viral (Mettenleiter, 2000).

2.10.1.2. La cápside

La cápside de los alfa herpesvirus se encarga de proteger al genoma. Consiste en 162 capsómeros: 150 hexones y 12 pentones. En la cápside; la proteína VP5, codificada por el gen ubicado en la región UL19, es la de mayor importancia conformacional (Nauwynck *et al.*, 2007).

2.10.1.3. El tegumento

El tegumento ocupa el espacio entre la cápside y la envoltura de la partícula viral; morfológicamente, consta de dos capas, una interna fuertemente unida a la cápside, y otra externa muy heterogénea que interactúa con los dominios citoplasmáticos de las proteínas del virus (Lin *et al.*, 2004).

Estructuralmente, está constituido por proteínas codificadas por el virus y actina, proveniente de la célula en la cual el virus se replica. Las proteínas de tegumento desarrollan un papel importante en la entrada del virión y la morfogénesis viral, pero poseen escasa importancia en el transporte de la cápside hacia el núcleo (Antinone *et al.*, 2006; Nauwinck *et al.*, 2007).

2.10.1.4. La envoltura

La envoltura viral es obtenida a partir de la membrana de la célula infectada, durante el ensamblaje en las vesículas de transGolgi. Ésta contiene 10 glicoproteínas: gB, gC, gD, gE, gH, gI, gK, gL, gM y gN (Nauwinck *et al.*, 2007).

Las proteínas de la envoltura desempeñan un papel importante desde el punto de vista inmunológico (modulan la respuesta inmune) y biológico del virus (intervienen en el ingreso y egreso del virus, propagación del virus de célula a célula). Sin embargo, cabe mencionar que tanto la región interna como la externa a la envoltura, albergan la misma importancia en el desarrollo de la replicación viral. (Nauwinck *et al.*, 2007).

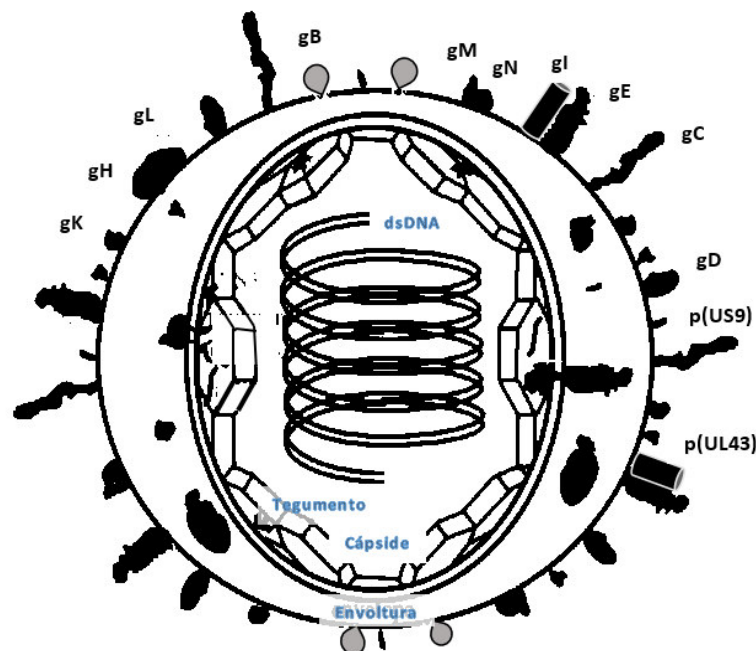


Gráfico 1. Estructura del ADV

2.10.2. Replicación viral:

2.10.2.1. El ingreso del virus a la célula

La adherencia del virus del ADV a la superficie celular se inicia a partir de la unión de su proteína gC al receptor heparán sulfato (HS), presente en la membrana de la célula afectada (Shukla y Spear, 2001). Ésta es una unión débil; por tanto, la inmediata unión de la proteína viral gD a los receptores celulares Nectina 1, Nectina 2 y CD55, refuerza la unión gC-HS, y con ello estabiliza la adherencia virus-célula. (Mettenleiter, 2000).

La fusión de la envoltura viral a la membrana celular citoplasmática está mediada por la unión de las proteínas gB, gH/gL y gD a sus respectivos receptores (aún no identificados), por esta vía es que la cápside ingresa al interior de la célula (Klupp *et al*, 2008).

Finalmente, la cápside viral interactúa con la proteína Dineína, una proteína motora asociada a los microtúbulos del citoplasma celular para ser transportada a la periferia del poro nuclear, por donde hace su ingreso al núcleo celular (Granzow *et al.*, 1997; Kaelin *et al.*, 2000).

2.10.2.2. La liberación y transcripción del ADN en el núcleo.

Una vez que el ADN es liberado en el núcleo de la célula se desencadena la transcripción, resumidos en tres eventos que a continuación serán descritos:

d) Transcripción de los genes inmediatamente tempranos (IE):

Es promovido por regiones promotoras y actividades transcripcionales del ARN polimerasa II de la célula huésped. El ADV contiene un único gen IE. Los ARNm virales son transportados al citoplasma para ser traducidos en proteínas que luego regresan al núcleo para activar la transcripción de otros genes. La proteína IE180 es la única proteína inmediatamente temprana; sus funciones son regular la expresión génica en esta etapa y desencadenar la expresión de los genes tempranos en el subsecuente evento transcripcional (Mettenleiter, 2000).

e) *Transcripción de los genes tempranos (E):*

En esta etapa, la proteína IE180, descrita anteriormente, cumple la función de activadora y promotora de los genes tempranos (Nauwynck *et al.*, 2007; Tóth, 2010).

Los genes tempranos EP0, UL54 y UL48 codifican proteínas requeridas para la replicación del ADN viral y la síntesis de nucleótidos; una de las más importantes es la proteína EP0, la cual autorregula la transcripción de los genes en esta etapa (Tombácz, 2012).

Las proteínas que son codificadas a partir de los genes E y se encargan de la síntesis de nucleótidos son: UL23, UL39/UL40 y UL50; mientras que aquellas que se encargan de la replicación del ADN son: UL5, UL8, UL9, UL29, UL30, UL42 y UL52 (Nauwynck *et al.*, 2007).

El gen UL23 codifica la Timidina Kinasa, la cual es fosforilada en desoxitimidintrifosfato, que constituye uno de los cuatro componentes del ADN viral. La Timidina Kinasa es asociada a la neurovirulencia; por tanto, la atenuación de esta enzima contribuye a la atenuación del virus para el porcino (Nauwynck *et al.*, 2007).

- La replicación del ADN viral:

Las proteínas codificadas por UL5, UL8 y UL52 forman un complejo helicasa-primasa heterométrica, que junto con la p(UL9) reconocen el sitio de iniciación de la síntesis de ADN y desenrolla el superenrollado ADN. Los productos del UL30 y UL42 forman el ADN dependiente de ADN polimerasa que utiliza el mecanismo denominado “círculo rodante”, para producir una larga cadena de moléculas de ADN concatémico de extremo a extremo (Nauwynck *et al.*, 2007).

f) *Transcripción de los genes tardíos*

Los genes tardíos requieren de la previa replicación del ADN con el fin decodificar proteínas necesarias para el ensamblaje y egreso del virión. Estas proteínas son las que conformarán la cápside y el tegumento mientras que otras serán dirigidas a las organelas como el retículo endoplásmico para ser glicosiladas.

2.10.2.3. El ensamblaje

El ensamblaje ocurre en el núcleo celular. A partir de las proteínas estructurales, codificadas por los genes tardíos, se conforma la cápside. Mientras que el ADN concatémico se escinde en formas monoméricas y al mismo tiempo es llevado hacia el interior de las cápsides recién formadas a través del poro cilíndrico para formar finalmente la nucleocápside (Klupp, 2005).

2.10.2.4. Formación de la Envoltura y Egreso de la Partícula viral.

En la formación de la envoltura del virus suelen estar involucrados dos eventos; un envolvimiento primario y un envolvimiento secundario

El envolvimiento primario ocurre a partir de la unión de la proteína del tegumento UL31 con la proteína transmembrana UL34 ubicada en la membrana nuclear interna de la célula afectada. Luego la nucleocápside sale hacia el citoplasma por gemación donde es rodeada por las proteínas del tegumento (Schulz *et al.*, 2014).

Continúa el envolvimiento secundario, este evento ocurre en las vesículas del *trans*-Golgi, en cuya membrana se encuentran ancladas las glicoproteínas de la envoltura las cuales interaccionan con las proteínas del tegumento para formar la envoltura. Finalmente se produce la salida del virus por exocitosis (Mettenleiter, 2000).

2.10.3. Factores de virulencia

Es conocido que la virulencia de una cepa está determinado por tres clases de proteínas que forman parte de su estructura: glicoproteínas de la envoltura viral, proteínas de la cápside y enzimas virales. Como en todos los miembros de los virus Herpes, las enzimas virales son precursores de ciertos componentes del ADN viral; por tanto son considerados los mayores determinantes de la virulencia (Nauwynck *et al.*, 2007). La Timidina Kinasa es el factor de virulencia del ADV más conocido; se demostró que la ausencia de proteínas para su codificación afecta la replicación y excreción del virus en el cerdo. (Klupp *et al.*, 2008)

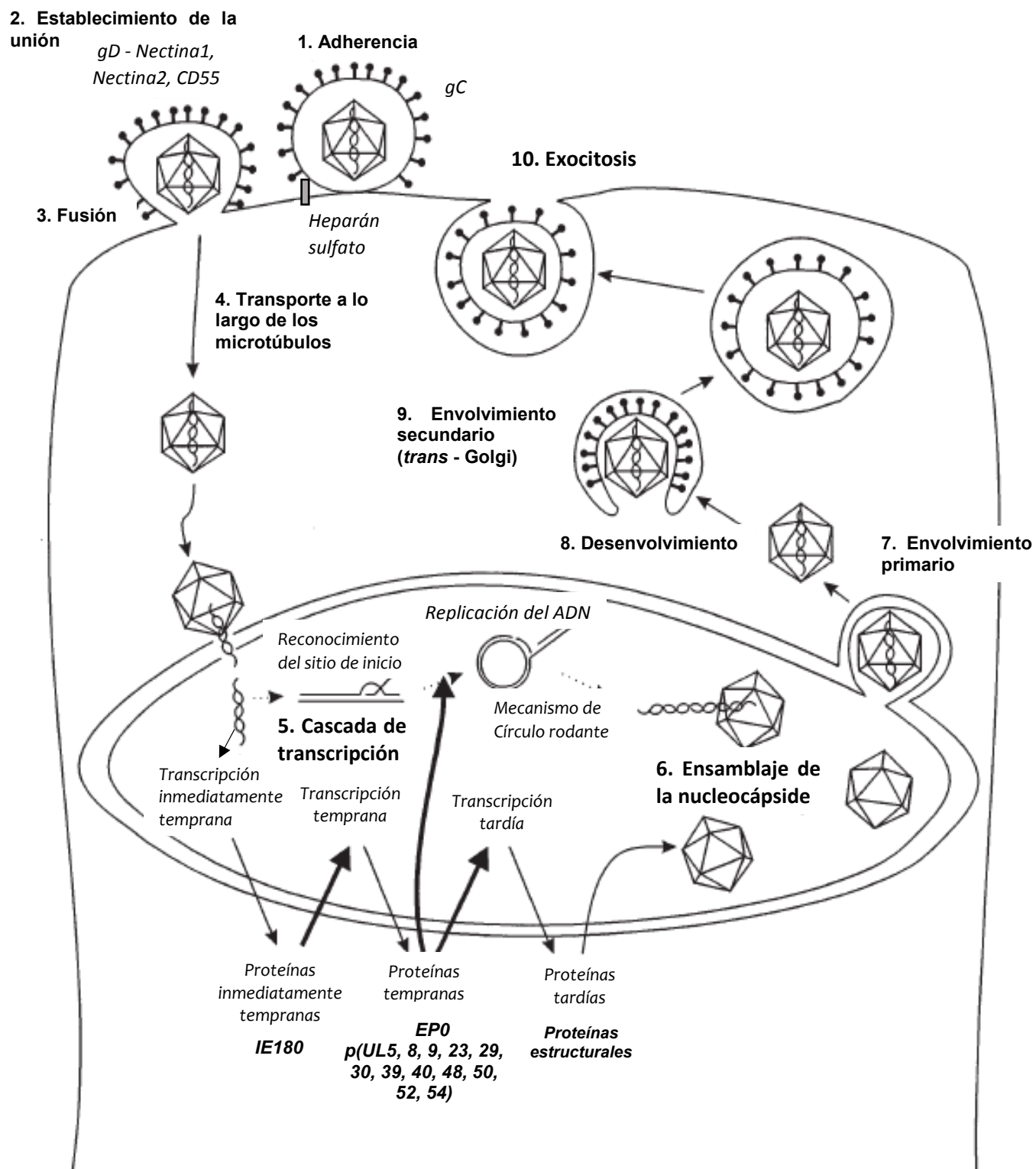


Gráfico 2.- Replicación del virus del ADV

2.11. Patogenia

La patogenia de la enfermedad de Aujeszky está mediada por la interacción de varios factores como la virulencia de la cepa, ruta de ingreso del virus, dosis infectiva, edad y estado inmunológico del animal (Papageorgiou *et al.*, 2011).

La virulencia del ADV está determinada por su capacidad o tropismo para replicarse en células del sistema nervioso y del tejido respiratorio, e invadir al organismo.

La puerta de entrada del virus es la vía oronasal. Experimentalmente se ha demostrado que la infección es efectiva por esa vía y también por vía intramuscular, intravenosa, cerebral, gástrica, traqueal, conjuntival, uterina y prepucial; así mismo, en granjas donde se usa la inseminación artificial, el semen contaminado también puede transmitir la enfermedad (Althouse, 2011; Maes *et al.*, 2008).

La dosis de virus requerida para reproducir la enfermedad es dependiente de la edad y la vía de transmisión. Así la dosis del virus necesaria para infectar lechones lactantes por administración intranasal se estimó en 1-3 log₁₀TCID₅₀ mientras que los animales de 6 semanas de edad pueden ser infectados con dosis iguales o superiores a 3 log₁₀TCID₅₀. Se necesitan dosis más grandes del virus para la introducción de la enfermedad por vía oral que por vía nasal. (Jakubik, 1977)

Luego de su ingreso el virus lleva a cabo su primer ciclo de replicación en el epitelio de las tonsilas y la mucosa nasofaríngea; para luego acceder a las células del bulbo olfatorio donde sucede la segunda replicación. A las 18 horas post exposición el virus puede ser aislado en epitelio respiratorio y de las tonsilas, y a las 24 horas del bulbo olfatorio (Mettenleiter, 2000).

En seguida se produce la diseminación por vía linfática hacia los nódulos linfáticos regionales, la ruta de migración está determinada por el sitio de replicación inicial (Iglesias, 1987); si la vía de infección (sitio de replicación inicial) ha sido oral, el virus avanza por los axones del nervio trigémino hasta la médula oblonga, puente y tronco cerebral, estableciéndose así la latencia en el ganglio trigémino; en cambio, si la vía de infección ha sido oronasal, el virus

se disemina por los nervios olfatorios y glosofaríngeos hasta la médula oblonga; el objetivo del virus es alcanzar el bulbo olfatorio y demás estructuras nerviosas, para establecerse en SNC. Se ha demostrado que la supresión de la glicoproteína D, disminuye la capacidad del virus para difundirse por vía nerviosa al sistema nervioso central (SNC). (Nauwynck, 1997)

Las cepas de baja virulencia causan infecciones estrictamente neurotrópicas y afectan a animales de todas las edades; sin embargo, los signos clínicos sólo se manifiestan en aquellos cuya edad sea menor a dos semanas. Las cepas de mayor virulencia, en cambio, causan infecciones generalizadas originando patologías del tracto respiratorio, nervioso y reproductivo, con marcada afinidad por el epitelio respiratorio.

La replicación viral en mucosa nasal y faríngea, permite que el virus infecte a la tráquea, los bronquios y los alveolos pulmonares. En cerdos susceptibles el virus se replica en las células epiteliales y fibroblastos del tracto respiratorio alto; además del macrófago pulmonar. La replicación del virus en el tracto respiratorio bajo no es común (Nauwynck *et al.*, 2007).

Esta replicación ocasiona un gran influjo de fagocitos, lo que origina la destrucción del epitelio pulmonar (los lóbulos cardíaco y craneal del pulmón son los más afectados); este evento, junto con la llegada del ADV a los nódulos linfáticos regionales, modifica los mecanismos de defensa pulmonar, favoreciendo las infecciones secundarias, y refuerza la diseminación del virus, a través del torrente sanguíneo, hacia otros tejidos como el útero. Si la marrana está gestando, el ADV atraviesa la barrera placentaria e infecta a los embriones o fetos, ocasionando reabsorciones, momificaciones, abortos, mortinatos o malformaciones, dependiendo del período de gestación en el que se produzca la infección (Nauwynck *et al.*, 2007).

Las infecciones secundarias en pulmón, ocasionadas principalmente por *Pasteurella*, *Mycoplasma*, *Actinobacillus* u otras bacterias, originan neumonías de curso fatal (Pejsak y Truszczyński, 2006).

La replicación secundaria está menos difundida debido a que la respuesta inmunitaria aparece a los 6 a 7 días post infección, sin embargo el virus aún puede ser aislado de las tonsilas por encima de los 18 días post infección y de la mucosa nasal por 13 días (Nauwynck, 1997).

2.12. Signos clínicos

De acuerdo a la presencia de signos clínicos, se pueden distinguir dos formas de presentación:

- Aguda: Ocasionado por cepas de alta virulencia; suelen afectar a cerdos adultos.
- Subclínica o Inaparente: Ocasionado por cepas de baja virulencia; utilizan la latencia como mecanismo de persistencia viral.

El período de incubación del ADV oscila entre 1 y 11 días, aunque en infecciones naturales la aparición de los signos clínicos se lleva a cabo después de 3 a 6 días. Algunos lechones pueden morir en algunas horas sin presentar signos (Wittmann, 1985; Papageorgiou *et al.*, 2011).

Los signos clínicos, se manifiestan de acuerdo a la edad y el estado inmunológico del animal, así como por la virulencia y la dosis infectante del virus (OIE, 2012).

- Edad del animal y estado inmunológico:

La presentación de signos clínicos es más severa entre menos edad tengan los animales y más frágil sea su estado inmune; los cerdos jóvenes procedentes de cerdas no inmunizadas son extremadamente susceptibles, por lo que, debido a las lesiones en el tejido nervioso, existe una alta tasa de mortalidad cercana al 100% durante las dos primeras semanas de vida, la cual disminuye al 50% en la tercera y cuarta semana de edad, y a menos del 5% entre los 4 a 6 meses de edad. En lechones jóvenes se producen signos marcadamente nerviosos.

En los cerdos adultos y en etapa de engorde los signos son más leves o inclusive pueden estar ausentes; además suelen ser de tipo respiratorio (Zuckermann, 2000; OIE, 2012).

- Virulencia de la cepa

Cepas de baja virulencia están relacionados a signos clínicos de naturaleza neurotrópica, mientras que aquellas que son de mayor virulencia generalmente causan infecciones generalizadas, que se manifiestan a través de tres formas clínicas: La forma nerviosa, respiratoria y reproductiva. El cerdo puede desarrollar cualquiera de estas tres formas clínicas.

2.12.1. Forma nerviosa:

La forma nerviosa de la enfermedad es común en lechones lactantes de hasta 3 semanas de edad, el período de incubación varía de 1 a 5 días y puede manifestarse debido a la infección por cepas de baja o mayor virulencia; sin embargo las de baja virulencia están relacionados exclusivamente con estos efectos neurotrópicos (Klupp *et al.*, 2008; Papageorgiou *et al.*, 2011).

En los lechones jóvenes los signos clínicos primarios son depresión, postración, anorexia e hipertermia seguido de trastornos neurológicos graves: temblores, falta de coordinación, ataxia, nistagmo, opistótono, convulsiones y sialorrea, por ello la denominación de pseudorabia. Algunos presentan parálisis de los miembros posteriores y adoptan lo que se denomina posición “perruna” mientras que otros pueden arrastrarse o caminar en círculos (OIE, 2012; Papageorgiou *et al.*, 2011).

A medida que la enfermedad progresa, puede haber tics, tenesmo, lamido excesivo de ollares, masticación continua, sudoración, emisión de sonidos, respiración lenta y coma; en general, una vez que desarrollan los signos neurológicos el animal muere generalmente dentro de 24 a 36 horas (Boadella *et al.*, 2012). En los animales de engorde se pueden presentar estos signos, pero son más moderados.

2.12.2. Forma respiratoria:

Está relacionada con las cepas de mayor virulencia y afecta sobre todo a los cerdos destetados, en engorde o acabado, aunque también puede presentarse en adultos. El virus puede llegar al tejido respiratorio de tres formas: directa, mecánica (cercanía de tejidos) o por diseminación (luego de llegar al SNC); las tres circunstancias pueden interaccionar para desencadenar el cuadro respiratorio.

El cuadro clínico comienza con hipertermia (hasta 42°C), anorexia y signos respiratorios: rinitis acompañada de estornudos y descarga nasal, que suele progresar, en función del estado sanitario de la pía infectada, hasta cuadros de neumonía ocasionados por infecciones secundarias bacterianas y virales. (OIE, 2012)

Los microorganismos oportunistas más comunes son *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Streptococcus suis*, virus de la influenza porcina y PRRS. Producto de esta infección secundaria, el cuadro clínico se complica ocasionando la muerte en algunos animales, mientras que aquellos que sobreviven presentan un pobre crecimiento, lo cual origina pérdidas económicas. En este grupo de cerdos la morbilidad puede alcanzar el 100%, pero en casos de ausencia de infecciones secundarias complicadas, la mortalidad oscila entre el 1 y el 2% (Pejsak y Truszczyński, 2006). La mortalidad en general decrece con la edad del animal; en los cerdos entre 5 y 9 semanas de edad la mortalidad puede acercarse al 50%; en los cerdos entre 5 y 9 meses de edad la mortalidad es inferior al 10% y suele ser de 1 a 2% en cerdos de acabado (Zuckerman, 2000).

Los cerdos destetados tienden a recuperarse después de 5 a 10 días; mientras que en los adultos la infección suele ser leve o inaparente, y en casos esporádicos puede ir acompañado de signos neurológicos, donde la enfermedad es fatal (Pejsak y Truszczyński, 2006).

2.12.3. Forma reproductiva:

La forma reproductiva se manifiesta en animales adultos. En cerdas gestantes, el virus puede atravesar la placenta, infectar y matar al embrión o feto, dependiendo de la etapa gestacional en la cual se encuentre.

Cuando la infección ocurre en el primer tercio de gestación se produce la reabsorción del embrión con el consiguiente retorno al estro (Hong *et al.*, 2002). Si la infección ocurre en el segundo o tercer tercio de gestación acontecen los abortos, momificaciones y nacimiento de crías muertas o muy débiles que mueren dentro de las 48 horas de nacido (disminuye considerablemente la tasa de crecimiento de los sobrevivientes) (Hong *et al.*, 2002; Ceriatti, 1992). La secuela más importante de infección durante la gestación es la infertilidad temporaria o crónica, especialmente si los fetos son retenidos en el útero (Pejsak y Truszczyński, 2006).

En el caso de los cerdos reproductores, se observa cuadros de inflamación escrotal, periorquitis y caída de la calidad del semen, el virus es excretado por medio del semen hasta durante 10 días (Morilla, 1996).

2.13. Mecanismo de persistencia viral – Latencia

La latencia se especifica como una condición en la cual el ADN viral persiste dentro del animal, mas no se produce virus infeccioso (Mettenleiter, 2000). La latencia, es una característica de los herpesvirus. Se ha demostrado que la enzima Timidina Kinasa es el mayor determinante de la neurovirulencia y del establecimiento de la persistencia viral bajo la forma de latencia.

Cada célula latente alberga al menos 30 copias del genoma viral. Para el porcino doméstico, en el 30% de los casos el ADN del ADV se encuentra presente en las neuronas ganglionares de los ganglios trigémino y raíz dorsal del ganglio sacro, además del bulbo olfatorio y la médula oblonga; con menos frecuencia establece latencia en el tronco cerebral y médula espinal. Aún no se puede afirmar que los tejidos linfoides como las tonsilas sean verdaderos sitios de latencia del virus (Maes *et al.*, 1997).

Hasta 13 meses después de la infección, el genoma ADV persiste tanto cualitativa como cuantitativamente en un estado estable en diferentes áreas del sistema nervioso periférico y central (Rizha *et al.*, 1986). En el caso de los cerdos salvajes el sitio más frecuente de latencia es el ganglio sacro, seguido del ganglio trigémino y las amígdalas (Romero *et al.*, 2003).

2.13.1. Bases moleculares de la latencia

Si bien el genoma viral no es infectivo durante la latencia, se le puede considerar transcripcionalmente activo (Rock *et al.*, 1987) Como otros alfa herpesvirus, el ADV posee genes cuya expresión está restringida a la latencia. El proceso de transcripción se lleva a cabo en una parte distinta del genoma viral que son denominados *sitios de transcripción asociados a la latencia*, sitio correspondiente al gen IE, que originan genes *transcritos asociados a la latencia* o LATs (Lokensgard *et al.*, 1990; Jin y Scherba, 1999; Mettenleiter, 2000). Estos LATs son antiparalelos a los genes inmediatamente tempranos ICP0 e ICP4; por lo que se sugiere que estos genes desempeñan un papel en el establecimiento y/o el mantenimiento de la latencia viral. Sin embargo, existen investigaciones en las que se demuestra que el virus es capaz de producir latencia aunque se use un mutante de delección que carezca de la capacidad de expresar LAT, lo cual sugiere la existencia de otros genes involucrados. (Cheung, 1989).

2.13.2. Etapas del ciclo latencia-reactivación

2.13.2.1. Establecimiento de la latencia:

El genoma viral ingresa a una neurona y se produce la infección aguda. Luego la expresión génica viral se extingue, con excepción de los genes LAT.

2.13.2.2. Mantenimiento de la latencia:

Este estadio permanece durante toda la vida del animal. El virus no puede detectarse por métodos estándares como la Inmunofluorescencia directa (IFD), debido a la ausencia de proteínas virales infecciosas; sin embargo, se le considera transcripcionalmente activo por la persistencia de los genes LAT. El uso de técnicas moleculares como la Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) permiten identificar el ADN viral en las células nerviosas o células del sistema inmune.

Los genes LAT protegen a las neuronas de cualquier estímulo apoptótico durante el mantenimiento de la latencia; es decir participan en la sobrevivencia neuronal (Jones, 2003).

2.13.2.3. Reactivación de la latencia:

Se produce por estímulos externos como el estrés y la inmunosupresión. Durante la reactivación, las proteínas y las partículas virales se expresan nuevamente y por ello pueden ser aisladas del ganglio trigémino o de fluidos nasales u oculares.

La reactivación viral suele dar lugar a infecciones recurrentes. Las infecciones como consecuencia de la reactivación viral, usualmente son de tipo subclínico de modo que el virus puede ser transmitido a otros animales susceptibles sin ser notado; aunque la excreción del virus normalmente es más reducida que en la infección primaria (Tanaka y Manen, 2014). Se sabe que las cepas virulentas pueden reactivarse más fácilmente que las cepas de baja virulencia

Una gran cantidad de acetilcolina puede estimular al sistema nervioso simpático de alguna manera para reactivar el virus (Tanaka y Mannen, 2014).

2.14. Epidemiología

Las infecciones naturales ocurren en suinos, bovinos, ovinos, caprinos, caninos y felinos, en animales salvajes como rata, ratón, conejo, venado y zorro y experimentalmente en muchas especies incluidas las aves. Los cerdos son los huéspedes principales del virus y se suelen infectar por vía respiratoria y digestiva. También por vía transplacentaria, o por inseminación artificial. La sensibilidad a la infección depende de factores tales como: virulencia de la cepa, concentración viral, vía de penetración, especie, edad, portador y estado del animal (Wittmann, 1985).

El ADV se encuentra distribuido a nivel mundial, sobre todo en lugares donde existe una gran densidad de cerdos. Es muy resistente a condiciones naturales de medio ambiente debido a su estabilidad frente al pH y a la temperatura. El virus es medianamente resistente al calor y muy resistente al frío. Puede sobrevivir a un pH entre 5 y 12.

La transmisión del ADV a los porcinos es generalmente por contacto directo vía aerógena (Nauwinck *et al.*, 2007) y tiene como órganos blancos primarios a las tonsilas y pulmones del animal (Kimman *et al.*, 1996). Las fuentes infección más comunes son las secreciones nasales, orofaríngeas, vaginales, prepuciales, leche y orina. Otras fuentes posibles serían las heces, aguas servidas, fomites, vísceras y carcasas contaminadas.

El rol de los vectores en la transmisión y diseminación del virus no está bien determinada, pero existen evidencias de que los roedores, aves y moscas pueden ser transmisores mecánicos del virus a animales susceptibles.

El problema principal del ADV es el establecimiento de la latencia en un tejido específico sin producir manifestación clínica. Las condiciones sanitarias, sobre todo en granjas no tecnificadas permiten fácilmente la reactivación viral y propagación del virus. La cepa viral que se encuentra en el Perú, es aparentemente de baja virulencia, por lo que la latencia se establece en animales adultos; cerdos de engorde y hembras en pie de cría.

En el Perú no existe información acerca de la presentación del ADV bajo su forma clínica, más si existe evidencia serológica de la presencia de anticuerpos neutralizantes solo en cerdos de crianza tecnificada.

En un estudio previo, no se encontraron animales seroreactores al virus del ADV en las muestras procedentes de las granjas tecnificadas del Valle de Lima; sin embargo, se encontró que el 27% de marranas procedentes de parques porcinos de los alrededores de Lima, fueron reactivos al virus del ADV (Manchego *et al.*, 1998).

2.15. Lesiones Macro y Microscópicas

Los signos clínicos están ampliamente relacionados a las lesiones. Las lesiones macroscópicas son a menudo sutiles, ausentes o difíciles de encontrar; en general, los animales jóvenes, lactantes o recién destetados presentan lesiones más claras que los animales adultos (Iglesias, 1987). Si la presentación de la enfermedad fue con signos respiratorios, podría encontrarse rinitis, edema, congestión y consolidación pulmonar, dependiendo del curso; además se observa aumento del tamaño de las tonsilas, faringe y tráquea. Los nódulos linfáticos pueden estar congestionados y presentar desde petequias hasta necrosis focal; además el virus se replica en los macrófagos alveolares eliminando transitoriamente los mecanismos de defensa del pulmón (Castro *et al.*, 2000); por lo que es común encontrar neumonías debido a infecciones bacterianas secundarias, que resultan en lesiones macroscópicas más evidentes (Morilla, 1996; Diosdado *et al.*, 2012). Los focos necróticos en el hígado o el bazo son comunes en los lechones (OIE, 2012).

Cuando predominan los signos nerviosos, se observa un marcado aumento del líquido cefalorraquídeo, congestión de la meninges, petequias en corteza y papilas renales y demás lesiones respiratorias, mencionadas líneas arriba.

Las lesiones microscópicas se observan en la sustancia blanca y gris del cerebro, donde se manifiesta por una meningoencefalitis no supurativa difusa y ganglioneuritis. Las meninges suelen estar engrosadas y se observan manguitos perivasculares mononucleares con predominio de linfocitos, necrosis neuronal, neuronofagia, gliosis perineuronal. Los cuerpos de inclusión

característicos aparecen en neuronas y células gliales, así como también en las células linfáticas. Los nódulos linfáticos presentan hiperplasia, hemorragias e infiltración neutrofílica.

Los hallazgos microscópicos relacionados a un cuadro respiratorio incluyen tonsilitis necrótica, bronquitis, bronquiolitis y alveolitis; con marcada proliferación de células del sistema mononuclear fagocítico y en raras ocasiones necrosis de los septos alveolares (Perfumo *et al.*, 2010)

La necrosis focal es común en el hígado, el bazo, las glándulas suprarrenales y los ganglios linfáticos de los fetos afectados (OIE, 2012)

Las lesiones placentarias en cerdas preñadas que han abortado por infección natural consisten en placentitis necrosante y la existencia de cuerpos de inclusión intranucleares (Blood y Radostits, 1990).

2.16. Respuesta inmunitaria

Como es natural cuando el virus ingresa en el animal se desencadena la infección primaria con lo que se activa la inmunidad natural o inespecífica, también conocida como primera línea de defensa, mediada por los neutrófilos, macrófagos, células naturalmente asesinas (NK), interferón (IFN), complemento y otros factores que limitan la adherencia del virus al tejido epitelial. El IFN es la primera barrera de defensa del hospedero frente a infecciones virales (Sen, 2001). Los IFN son producidos por las células afectadas alcanzando altos niveles en la secreción nasal y sangre en las primeras 72 horas y permanece elevado hasta que cese la replicación del virus.

Luego se desarrolla la inmunidad adquirida o específica, mediada por los linfocitos B (inmunidad humoral o mediada por anticuerpos) y linfocitos T (inmunidad celular o mediada por células).

Las glicoproteínas de la envoltura viral median la unión virus-célula. Los anticuerpos presentan dos mecanismos de acción frente al virus: Uno de carácter “preventivo” (forma directa) el cual se centra en evitar la unión virus-célula y otro de carácter “profiláctico” (forma

indirecta), que se centra en desestabilizar la misma unión; todo esto ocurre a través de la manipulación en la unión de las glicoproteínas; es decir las glicoproteínas desempeñan un papel prominente en probar respuestas inmunitarias humores y celulares en el huésped animal (Mettenleiter, 1996).

Cuando la inmunidad humoral actúa de forma directa bloquea el sitio de unión de las glicoproteínas evitando la adherencia y fusión a la célula. Cuando actúa de forma indirecta, los anticuerpos unidos a la glicoproteína viral activan al complemento y causan daño a la membrana celular, en donde está anclada la glicoproteína viral, conllevando a la muerte celular e inactivación del virus (Iglesias *et al.*, 1990).

La inmunidad humoral se demuestra por la presencia de IgM e IgG en el suero entre 5 y 6 días postinfección (pi); la IgM alcanza su máximo nivel entre los días 9 y 10 y luego disminuye, y la IgG entre los días 10 y 15 para luego permanecer constante (Rodak *et al.*, 1987). Los anticuerpos neutralizantes (AcN) aparecen a los 7 días pi y alcanzan su pico máximo en aproximadamente 2 a 3 semanas, permaneciendo luego por varios meses.

Las gC y gD constituyen los mayores inmunógenos del ADV, y junto con gB, gE, gH y gL juegan un rol muy importante en inducir anticuerpos neutralizantes (AcN) independientes del complemento en animales infectados; estos interfieren con la adherencia del virus durante una infección secundaria (Ober *et al.*, 2000).

La gC es el mayor blanco de las respuestas inmunes humoral y celular, tanto en animales infectados como vacunados. En cerdos convalecientes se ha demostrado, que una gran proporción de la actividad neutralizante está dirigida contra la glicoproteína gC (Ben-Porat *et al.*, 1986). Además, gC es el mayor blanco para linfocitos citotóxicos (CD8+) y células T colaboradoras (CD4+) (Zuckerman, 2000).

La gD es una de las glicoproteínas más inmunógenas. Los Ac dirigidos contra ella son más eficaces en neutralizar al ADV sin la ayuda del complemento (Eloit *et al.*, 1988), y pueden

proteger a los cerdos contra el desafío posterior del ADV al utilizar vacunas recombinantes que expresen gD o gC (Zuckerman, 2000).

La gB induce la producción de AcN en presencia o ausencia del complemento. Algunos autores indican un rol inferior de gE en la inducción de AcN, mientras que otros consideran a la gE como el blanco más importante en la respuesta inmune protectora. La gG, al no ser un constituyente de la envoltura viral, no produce actividad neutralizante (Mettenleiter, 1994).

Prosigue la inmunidad celular. Los linfocitos T (LT) sensibilizados diferenciados en células inmunes constituyen la inmunidad celular y pueden ser de dos tipos: LT citotóxicos o LT de memoria. Estos desempeñan su función de dos maneras diferentes: Por un lado producen linfoquinas, linfoquinas e interferón; mientras que por otro lado producen lisis de las células que contienen el antígeno en su superficie (función citotóxica) (Kimman *et al.*; 1996).

Por tanto, es deducible que los mecanismos de evasión del sistema inmune busquen interferir con la expresión de receptores de citocinas y quimocinas del hospedero, del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MHC-1) y de los interferones producidos (Ober *et al.*, 2000).

La apoptosis es un evento celular que se desencadena como producto de la infección viral; el mecanismo de persistencia de los virus herpes consiste en codificar proteínas que interfieren con esta señal evitando así la muerte celular (Pomeranz *et al.*, 2005)

Un factor de complicación es la capacidad de ADV para infectar productivamente células del sistema hematopoyético, que puede afectar a la respuesta inmune y también desempeñar un papel en la infección persistente o latente (Mettenleiter, 1994)

Incluso altos niveles de inmunidad pasiva adquirida no protege a los cerdos jóvenes contra el establecimiento de la infección latente después de la exposición a dosis bajas de virus de campo (McCaw *et al.*, 1997).

2.17. Dinámica de la infección

La forma más común de que una piara susceptible se contamine con el ADV es por medio de la introducción de animales portadores, o por el viento proveniente de granjas vecinas infectadas. La infección puede manifestarse a través de signos nerviosos, digestivos y respiratorios, dependiendo de la virulencia de la cepa y de la edad del animal. En el Perú no se ha reportado presencia clínica del ADV.

Generalmente el virus infecta a la mayoría de los animales; sin embargo, cuando ya no encuentra animales susceptibles deja de circular, entonces se mantiene infeccioso durante un periodo variable hasta que aparecen nuevamente animales susceptibles, que pueden o no ser de la misma granja.

Los rebrotes constituyen la etapa de amplificación del virus en la granja. La excreción del virus ocurre durante un periodo de varias horas o días, dependiendo de la dirección y velocidad del viento fácilmente puede infectar a los cerdos de la misma granja o de granjas vecinas. Las hembras infectadas en el momento del parto excretan el ADV e infectan a los lechones o a otros animales cerca de las maternidades. En el momento en que pierden los anticuerpos maternos los animales se tornan susceptibles (Cowen *et al.*, 1990).

Se debe procurar evitar la reactivación viral en los animales de engorde, porque es ahí cuando se disemina el virus en la piara. Solo mediante la evaluación serológica de las hembras de cría se puede conocer el estado real del virus dentro de la granja. Se puede decir que el virus no se reactiva si es que las hembras en pie de cría permanecen infectadas, pero los animales de engorde, jóvenes y hembras de reemplazo se mantienen seronegativos.

2.18. Diagnóstico

El diagnóstico de la enfermedad de Aujeszky se basa en los signos clínicos, lesiones macro y microscópicas, así como en los análisis serológicos (Cruz, 2009).

El diagnóstico en laboratorio, es efectuado directamente a través de la detección del agente (aislamiento del virus, y detección del antígeno o del ácido nucleico viral [reacción en cadena de la polimerasa (PCR)]) e indirectamente mediante la detección de anticuerpos específicos en suero de animales vivos (OIE, 2012).

Las muestras de elección que se deben remitir al laboratorio son las siguientes: suero, amígdalas, encéfalo, médula espinal, ganglio trigémino, pulmón y bazo (Sánchez, 2004).

2.18.1. Aislamiento viral

Es considerado el método con mayor sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de ADV. En animales vivos el virus se aísla a partir de material recogido de la nariz y garganta (hisopados buco-faríngeos) y en cerdos muertos a partir de un extracto de tejido, que puede ser encéfalo, amígdalas y pulmón, las cuales son inoculados en una línea celular susceptible como las de cornete nasal bovino (CNB). El éxito del aislamiento viral depende de que exista una cantidad considerable de partículas virales infectantes en los tejidos seleccionados (Iglesias, 1987).

Para la identificación del virus se aplican técnicas de detección de antígeno o ADN viral, con la finalidad de diferenciar el efecto citopático del originado por otros virus o factores tóxicos inespecíficos. La detección de antígeno viral se efectúa a través de las técnicas de inmunofluorescencia directa, inmunohistoquímica o la inmunoperoxidasa IPMA.

El aislamiento del SHV-1 confirma la enfermedad de Aujeszky; sin embargo, la falta de aislamiento no garantiza la ausencia de infección (OIE, 2012).

2.18.2. Detección de antígeno viral

A diferencia del aislamiento viral, la detección del antígeno viral es lo más útil, no complejo y además puede ser realizado mediante el uso de pruebas inmunohistoquímicas, como la inmunofluorescencia (IF) directa, así como la inmunoperoxidasa (IP). Estas técnicas permiten la visualización del antígeno viral en una muestra de tejido fresco mediante el empleo de un

anticuerpo policlonal o monoclonal conjugados con fluorocromos o enzimas respectivas (Delgado *et al.*, 2005).

2.18.3. Detección de ácido nucleico

El ADN vírico también puede identificarse mediante PCR, y esto se puede llevar a cabo empleando técnicas de PCR en tiempo real. La principal ventaja de la PCR es su rapidez en comparación con las técnicas convencionales de aislamiento del virus (Jestin *et al.*, 1990; OIE, 2012).

La técnica de PCR ofrece importantes ventajas ya que permite detectar el virus en estado latente, donde no se expresan antígenos virales, por lo que la PCR es la única vía para poner de manifiesto la presencia del virus latente en el animal.

2.18.4. Detección de anticuerpos

Las técnicas serológicas son las más utilizadas y constituyen la base del diagnóstico para las campañas de control y erradicación del ADV. Solo se aplican a los cerdos porque los demás animales mueren demasiado rápido como para producir anticuerpos. La presencia de anticuerpos contra el virus de la enfermedad de Aujeszky se pone de manifiesto mediante la neutralización del virus, la aglutinación en látex o el ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA). (OIE, 2012).

Es posible distinguir entre los anticuerpos producidos por infección natural y los originados después de la vacunación mediante el uso de vacunas cuyo ADN presenta genes eliminados. En las zonas donde se vacunan los cerdos con vacunas en las que se ha eliminado el gen de la gE, los kits de ELISA para la gE permiten diferenciar entre cerdos infectados y vacunados (DIVA), pero para evaluar el nivel de inmunidad inducida por la vacunación, deben emplearse kits de ELISA para la gB o virus neutralización (OIE, 2012).

2.18.4.1. Prueba de Aglutinación en Látex

Detecta anticuerpos específicos frente al virus, por aglutinación de partículas de látex recubiertas de glicoproteínas del virus. Es la técnica más sencilla y rápida, que permite obtener

un resultado rápido. Permite diferenciar entre la respuesta inmunitaria de los cerdos infectados de forma natural y la de los que han sido vacunados con vacunas de virus en cuyo ADN se ha eliminado el gen de la gE (Yong *et al.*, 2005).

2.18.4.2. ELISA

Es la técnica serológica más utilizada por su alta sensibilidad y especificidad, y la posibilidad de procesar un gran número de muestras en pocas horas de manera sencilla y económica.

Se han desarrollado diferentes métodos de ELISA de tipo indirecto, de bloqueo o competición. Dependiendo del tiempo de incubación puede llegar a detectar un mayor rango de anticuerpos en comparación con la prueba de virus neutralización. Debido a la presencia de anticuerpos maternos en el suero de los lechones, la interpretación de resultados puede complicarse.

Algunos de los kits de ELISA permiten diferenciar entre animales vacunados y los infectados de manera natural. Estos kits diferenciales están basados en técnicas de competición que detectan la presencia de anticuerpos anti-gE en suero, ya que las vacunas más usadas en el mercado son aquellas que presentan delección de la glicoproteína gE.

Para conocer el estado inmunológico de los animales vacunados pueden utilizarse otras pruebas comerciales; el análisis en este caso se realiza en función de la respuesta serológica frente a la glicoproteína gB (proteína esencial e inmunogénica) presente tanto en el virus de campo como en las vacunas actuales.

2.18.4.3. Virus neutralización

La técnica de virus neutralización (VN) es reconocida como el método serológico de referencia (Moenning *et al.*, 1982); es muy sensible y se utiliza fundamentalmente para la confirmación de casos positivos en áreas no sometidas a programas vacunales. La prueba se basa en la actividad neutralizante de los anticuerpos, que se detecta inoculando células susceptibles con una mezcla de suero más virus (Iglesias, 1987). Los anticuerpos neutralizantes provienen del

suelo de los animales sospechosos, que son producidos frente a las glicoproteínas gB, gC y gD, presentes tanto en las cepas del virus de campo como en las cepas vacunales, incluyendo las vacunas de subunidades. Mediante esta técnica se detectan animales positivos a partir del 8°-10° día post-infección (OIE, 2012).

En el Perú aún no está implementada la vacunación contra ADV; es por ello que la prueba de virus neutralización en este caso nos permitirá confirmar los casos positivos. Sin embargo, vale decir que de acuerdo con el plan de estrategia sanitaria planteada por el servicio nacional de sanidad agraria del Perú (SENASA) las vacunaciones contra la EA se implementarían más adelante en atención al impacto en la producción porcina que origine esta enfermedad.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.4. Obtención de las muestras de suero porcino

Las muestras fueron obtenidas de 463 cerdos, entre machos y hembras de 130 a 150 días de edad aproximadamente, aparentemente normales, procedentes de criaderos semi-tecnificados de los parques porcinos de Villa el Salvador (n=100), Huachipa (n=59), Pamplona (n=48), Lurín (n=41), Ventanilla (n=41), San Juan de Lurigancho (n=34), Villa María del Triunfo (n=31), San Juan de Miraflores (n=27), La Molina (n=19), Chosica (n=16), San Bartolo (n=14), Carabayllo (n=14), Chorrillos (n=12) y Chilca (n=07), todas las muestras fueron obtenidas en el Camal de Yerbateros durante el beneficio. La procedencia y el número de muestras se describen en el Cuadro 1.

Las muestras colectadas fueron de suero. Ningún animal fue sacrificado con el único fin de obtener las muestras. La sangre fue tomada en el momento del beneficio; las muestras fueron transportadas de inmediato a la Sección de Virología del Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos; las muestras se dejaron reposando doce horas a medio ambiente para separar el suero, y finalmente se procedió a extraerlo para mantenerlos en refrigeración a -20°C hasta el momento de su procesamiento.

Cuadro 1.- Procedencia y número de muestras de sangre porcina obtenidos por distrito y punto cardinal.

UBICACIÓN EN LIMA (punto cardinal)	Distrito	Número de muestras obtenidas por distrito	Número de muestras obtenidas por punto cardinal
NORTE	Carabaylo	14	55
	Ventanilla	41	
SUR	San Juan de Miraflores	27	280
	Pamplona	48	
	Lurín	41	
	San Bartolo	14	
	Villa El Salvador	100	
	Villa María del triunfo	31	
	Chilca	07	
	Chorrillos	12	
ESTE	San Juan de Lurigancho	34	128
	Huachipa	59	
	Chosica	16	
	La Molina	19	
Total	14 distritos	463	463

3.5. Materiales

3.5.1. Equipos del Laboratorio

Aparato de flujo laminar, cabina de células tipo III, estufa con CO₂, estufa, microscopio de luz invertida, propipeta, pipetas: micropipetas de 50 y 100 ul, pipeta multicanal de 50 y 100 ul, pipetas simples (1, 5 y 10 ml); shaker, refrigeradora y congeladora.

3.5.2. Reactivos y materiales de diagnóstico

Materiales de diagnóstico: Viales eppendorf, microplacas de 96 pocillos, frascos de cultivo celular: grandes y pequeños, tips, canaletas, alcohol y algodón.

Reactivos: Tripsina, suero fisiológico, medios para cultivo celular, diluyente más antibiótico.

- a. Cultivo de células: Se requirió de un cultivo de células secundarias de cornete nasal bovino (CNB), aisladas de acuerdo al protocolo desarrollado por la Sección de Virología del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria-UNMSM.
- b. Cepa viral: Se empleó una cepa viral procedente de Suiza, adaptada a células de cornete nasal bovino, con un título de 10^{-6} DI₅₀/0.05 ul.

3.6. Metodología

3.6.1. Prueba de Virus Neutralización

Es una prueba serológica utilizada para determinar la presencia y cantidad de anticuerpos neutralizantes o protectores en una muestra a través de su capacidad de neutralizar la infectividad del virus homólogo. Se utilizó el método de microtitulación en placas descartables de 96 pocillos (método beta, que consiste en sueros variables y virus constante).

3.6.2. Procedimiento

- Los sueros fueron inactivados a 56°C por 30 minutos.
- Se prepararon las 100 DI₅₀, 10 DI₅₀, 1DI₅₀ y 0.1 DI₅₀ del virus, correspondientes a los controles virales.
- Se distribuyó 50ul de diluyente en todos los pocillos de las microplacas, desde las hileras A hasta la H, con excepción de los pocillos destinados a ser el control celular.
- Se agregaron 50ul de cada uno de los sueros problemas sólo en los pocillos de la primera hilera horizontal correspondientes a las muestras, comenzando desde abajo.
- Se realizaron diluciones seriadas del suero, comenzando con la dilución 1:2, 1:4, 1:8 y 1:16.
- Se añadieron las 100 DI₅₀/0.05 ul del virus, con excepción del control celular.
- Las placas fueron incubadas a 37°C por 1 hora.
- Se añadió 100ul de una suspensión de células de cornete nasal bovino a todos los pocillos.
- Finalmente, las muestras fueron incubadas en el horno con 5% de CO₂ a 37°C y los resultados se leyeron a las 48 horas.

El título del suero fue la dilución mayor que neutralizó el 100% de la capacidad infectiva del virus.

3.6.3. Lectura

Los resultados se evalúan de acuerdo al efecto citopático que produce el virus.

La ausencia de efecto citopático indica presencia de anticuerpos neutralizantes; mientras que la presencia de efecto citopático indica ausencia de estos.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El 100% de las muestras de suero de los porcinos en estudio resultaron negativas a anticuerpos neutralizantes contra el virus herpes de la EA. El porcino al ser infectado en forma aguda o por la reactivación viral desarrolla anticuerpos contra el virus en títulos variables y de larga duración. El virus de la EA como todos los virus herpes tipo 1, pueden permanecer en estado de latencia en neuronas del ganglio trigémino de donde puede reactivarse de tiempo en tiempo induciendo respuesta inmune (Perng *et al.*, 1999), la ausencia de anticuerpos por tanto indica que el virus de la EA no estuvo presente en los criaderos de los porcinos.

Un factor que explique la seronegatividad podría ser la industrialización del sector porcino en los últimos años contribuyendo a la mejora de las condiciones de zoosanitarias y de crianza en general; haciendo hincapié en las crianzas de tipo tecnificada y semitecnificada, por lo que enfermedades de tipo crónicas y que establecen latencia como la EA podrían estar siendo eliminadas de la granja (Minag, 2013).

La edad de los animales podría ser otro factor explica la seronegatividad en estos animales, el presente estudio se realizó en muestras de suero de gorrinos de 130 a 150 días de edad, muestras de marranas adultas fueron muy escasas. De existir la infección con el virus de la EA podría estar confinada en el grupo de marranas o reproductores adultos, de modo que si la infección no se exagera o no se reactiva el virus permanecerá en latencia y podrían ir eliminándose con las hembras adultas de descarte. Morilla *et al.* (1995) indica que la EA se mantiene en la población de porcinos mediante los animales infectados en estado de latencia, en

algún momento los animales llegan a una fase en que el virus no se reactiva y los gorrinos de engorde y acabado incluso los de menor edad permanecen seronegativos.

En el Perú, la presentación clínica de la EA en porcinos u otras especies de animales no está documentada pero estudios serológicos realizados en porcinos de crianza no tecnificada de los alrededores de Lima Metropolitana y de tipo familiar en la sierra y selva, mas no en animales de granjas tecnificadas, evidenciaron la presencia de la infección aunque en porcentajes no mayores al 10% (Salas, 1997; Manchego *et al.*, 1998); recientemente SENASA, realizó un estudio de seroprevalencia de la EA en 1648 muestras de suero obtenido a nivel nacional mediante la prueba de ELISA indirecta encontrando en total 7 (0.42%) animales de crianza familiar seropositivos en Cerro de Pasco y Piura y no en animales de granjas tecnificadas de la costa (Portilla, Lima, comunicación personal, 2013). Estos resultados indican que el virus causante de la EA no está ampliamente difundida en la población porcina del país y el sistema de crianza juega un rol importante en la epidemiología de la enfermedad.

En un estudio realizado en marranas adultas provenientes de crianza no tecnificada de Lima se detectó antígeno del virus de la EA en tonsilas, nódulos linfáticos y bazo en el 6.5% (12/185) de las marranas (Cerón, 1997), y De la Cruz (1998) encontró antígeno del virus de la EA en el 15.5% (17/110) de marranas con problemas neumónicos del parque porcino de Ventanilla. Sin embargo, en el presente estudio las muestras de suero analizadas de porcinos de Ventanilla fueron negativas a anticuerpos incluídas dos marranas.

Los animales seropositivos a la EA detectados en el país han sido animales adultos sin signos clínicos y únicamente en cerdos de crianza familiar y de crianza no tecnificada, a diferencia de algunos casos ocurridos en países como Bolivia donde la EA reapareció en lechones de granjas porcinas de crianza intensiva con alto porcentaje de mortalidad en las provincias del Chaco y Chuquisaca en el 2005 (OIE, 2005). La ausencia de infección de porcinos de granjas de crianza intensiva del país podría indicar además del buen sistema de crianza, la poca densidad de granjas que representen riesgos de transmisión vía aerógena. Se considera que el virus en aerosol puede ser infectante hasta una distancia de 3 km, e incluso hasta 80 km si las condiciones de humedad, temperatura y distancia son las adecuadas (Althouse y Rossow, 2011).

Las pruebas disponibles para la detección de anticuerpos contra el virus de la EA son ELISA, Aglutinación en látex, neutralización viral (NV), esta última considerada prueba estándar. La prueba de ELISA es más utilizada por su facilidad y permite procesar numerosas muestras comparado con la prueba de NV, además la prueba de ELISA presenta una especificidad y sensibilidad de más de 90% (Boadella *et al.*, 2012), a diferencia la sensibilidad de la prueba de NV es menor dependiendo del sistema indicador utilizada (Kinker *et al.*, 1997; OIE, 2012). Por tanto, un resultado negativo a la prueba de NV en animales de una granja no descartaría totalmente que los animales no estén infectados ya que la infección podría estar en estado de latencia en los porcinos adultos (McCaw *et al.*, 1997).

Como se ha mencionado la industria porcina en el país está desarrollándose y según el INEI (2012) la población ha crecido en 1.7% en relación al censo agropecuario de 1994. La EA es uno de los causantes de problemas reproductivos y respiratorios por tanto es necesario continuar con los estudios de monitoreo con fines de vigilancia. Bajo este criterio, el resultado del presente estudio no descarta la posibilidad de que el virus de la EA existe en los animales de crianza semi-tecnificada. Para conocer con certeza el estado de la infección por el virus de la EA en la población porcina de crianza semitecnificada sería necesaria la evaluación serológica de las hembras y machos adultos que son los que albergan el virus en estado latente y por lo menos una vez al año.

V. CONCLUSIONES

No se detectaron anticuerpos contra el virus de la enfermedad de Aujeszky en muestras de suero de porcinos de 130 a 150 días de edad provenientes de crianza semi-tecnificadas de los parques porcinos de Villa El Salvador, Huachipa, Pamplona, Lurín, Ventanilla, San Juan de Lurigancho, Villa María del Triunfo, San Juan de Miraflores, Chosica, San Bartolo, Carabaylo, Chorrillos y Chilca.

VI. LITERATURA CITADA

1. **Althouse GC, Rossow K. 2011.** Structural determinants for nuclear envelope localization and function of pseudorabies virus pUL34. J Virol 86(4): 2079-2088.
2. **Antinone S, Shubeita G, Coller K. 2006.** The herpesvirus capsid surface protein, VP26, and the majority of the tegument proteins are dispensable for capsid transport toward the nucleus. J Virol 80 (11): 5494-5498.
3. **Ben-Porat T, Demarchi J, Lomniczi B, Kaplan AS. 1986.** Role of glycoproteins of pseudorabies virus in eliciting neutralizing antibodies. J Virol 154 (2): 325-334.
4. **Blood DC, Radostits OM. 1990.** Veterinary Medicine. 7^a ed. Bailliere Tindall, London. 1310p.
5. **Boadella M, Gortázar Ch, Vicente J, Ruiz-Fons F. 2012.** Wild boar: an increasing concern for Aujeszky's disease control in pigs?. BMC Vet Res 8(1): 7.
6. **Brukman A, Enquist, L. 2006.** Suppression of the interferon-mediated innate immune response by pseudorabies virus. J Virol 80(13): 6345-6356.
7. **Castro DA, Diosdado VF, Rosales OC, León CA, Morilla GA. 2000.** Frecuencia de la enfermedad de Aujeszky en granjas porcinas de ciclo completo de la zona centro de México. Rev Mex Tec Pec 38 (2):81-88.
8. **Ceriatti FS, Sabini LI, Bettera SG. 1992.** Experimental infection of pregnant gilts with Aujeszky's disease virus strain RC/79. Rev Argent Microbiol 24(2): 102-112.

9. **Cerón ME. 1997.** Detección de antígenos y anticuerpos contra el virus de la pseudorrabia en marranas de crianza no tecnificada. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 37 p.
10. **Cheung AK. 1989.** Detection of pseudorabies virus transcripts in trigeminal ganglia of latently infected swine. *J Virol* 63(7): 2908-2913.
11. **Cowen P, Li S, Guy JS, Erickson GA, Blanchard D. 1990.** Reactivation of latent pseudorabies virus infection in vaccinated commercial sows. *American J Vet Res* 51(3): 354-358.
12. **Cunha, EMS. 2006.** Antibodies against pseudorabies virus in feral swine in southeast Brazil. *Vet Res* 58(4): 462-466.
13. **Cruz CHO. 2009.** Desempeño profesional en el Centro Nacional de Servicios de diagnóstico en Salud Animal (CENASA). Tesis de Médico Veterinario Zootecnista. México: Univ. Nac. Autónoma de México. 25 p.
14. **Davison AJ, Eberle R, Ehlers B, Hayward GS, McGeoch DJ, Minson AC, Pellet PE, Roizman B, Studdert MJ, Thiry E. 2009.** The Order *Herpesvirales*. *Arch Virol* 154(1): 171-177.
15. **Delgado ID, Valle MB, Barrero NR, Miranda LS, Elvira SM, Carrasco AC. 2005.** Use of direct immunofluorescence and immunoperoxidase diagnostic kits for bovine parainfluenza 3 and bovine herpes virus in Cuba. *Vet Méx* 36(3): 295-302.
16. **Diosdado VF, Córdova LD, Socci EG, González VD, Morilla GA. 2012.** Sinergismo potencial entre el virus de la enfermedad de Aujeszky, *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Actinobacillus pleuropneumoniae* en cerdos de engorda. *Rev Mex Cienc Pecuarias* 37(1)
17. **Eloit M, Fargeaud D, L'haridon RI, Toma B. 1988.** Identification of the pseudorabies virus glycoprotein gp50 as a major target of neutralizing antibodies. *Arch Virol* 99(1): 45-56.
18. **Estadísticas. 2012.** Instituto Nacional de Estadística e Informática. [Internet] [12 abril 2014]. Disponible en: <http://www.inei.gob.pe/>

19. **[FAO] Landín-Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 2007.** [Internet] [28 de octubre 2014] Disponible en: <http://www.fao.org/wairdocs/LEAD/X6372S/x6372s08.htm>
20. **Granzow H, Weiland F, Jons A, Klupp B, Karger A, Mettenleiter TC. 1997.** Ultrastructural analysis of the replication cycle of pseudorabies virus in cell culture: a reassessment. *J Virol* 71 (3): 2072-2082.
21. **Hong W, Xiao Sh, Zhou R, Fang L, He Q, Wu B, Zhou F, Chen H. 2002.** Protection induced by intramuscular immunization with DNA vaccines of pseudorabies in mice, rabbits and piglets. *Vaccine* 20(7): 1205-1214.
22. **Iglesias G. 1987.** Infección con el virus de la enfermedad de Aujeszky en cerdos. *Cienc Vet* 4: 225- 255.
23. **Iglesias G, Molitor T, Reed D, L'Italien J. 1990.** Antibodies to Aujeszky's disease virus in pigs immunized with purified virus glycoproteins. *Vet Microb* 24(1):1-10.
24. **King A, Lefkowitz E, Adams M, Carstens E. 2012.** Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses En: International Union of Microbiological Societies, eds. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier 9: 37-44.
25. **Jakubik J. 1977.** Comparative susceptibility of rabbits, rats, mice and pigs to infection with Aujeszky's disease virus (ADV) in the development and efficacy test for ADV vaccines. *Zbl Vet Med B* 24:765-766.
26. **Jestin A, Foulon T, Pertuset B, Blanchard P, Labourdet M. 1990.** Rapid detection of Pseudorabies virus genome sequences in biological samples from infected pigs using polymerase chain reaction DNA amplification. *Vet Microbiol* 23 (1): 317-328.
27. **Jin L, Scherba G. 1999.** Expression of the pseudorabies virus latency-associated transcript gene during productive infection of cultured cells. *J Virol* 73(12): 9781-9788.
28. **Jones C. 2003.** Herpes simplex virus type 1 and bovine herpesvirus 1 latency. *Clin Microbiol Rev* 16(1): 79-95.

29. **Kaelin K, Deselee S, Masse MJ, Bras F, Flamand A, 2000.** The UL25 protein of pseudorabies virus associates with capsids and localizes to the nucleus and to microtubules. *J Virol* 74(1): 474-482.
30. **Kimman TG, De Bruin TG, Voermans JJ, Bianchi AT. 1996.** Cell-mediated immunity to pseudorabies virus: cytolytic effector cells with characteristics of lymphokine-activated killer cells lyse virus-infected and glycoprotein gB and gC transfected L14 cells. *Journal of general virol* 77(5): 987-990
31. **Kinker DR, Swenson SL, Wu LL, Zimmerman JJ. 1997.** Evaluation of serological tests for the detection of pseudorabies gE antibodies during early infection. *Vet Microbiol* 55(1): 99-106.
32. **Klupp BG, Altenschmidt J, Granzow H, Fuchs W, Mettenleiter TC. 2008.** Glycoproteins required for entry are not necessary for egress of pseudorabies virus. *J Virol* 82(13): 6299-6309.
33. **Lin HW, Chang YY, Wong ML, Lin JW, Chang TJ. 2004.** Functional analysis of virion host shutoff protein of pseudorabies virus. *J Virol* 324(2): 412-418.
34. **Lokensgard JR, Thawley DG, Molitor TW. 1990.** Pseudorabies virus latency: restricted transcription. *Arch Viro* 110(1-2): 129-136.
35. **Maes D, Nauwynck H, Rijsselaere T, Mateusen B, Vyt P, De Kruif A, Van Soom A. 2008.** Diseases in swine transmitted by artificial insemination: An overview. *Theriogenology* 70(8): 1337-1345.
36. **Maes RK, Sussman, MD, Vilnis A, Thacker BJ. 1997.** Recent developments in latency and recombination of Aujeszky's disease (pseudorabies) virus. *Vet microbiol* 55(1): 13-27.
37. **Manchego A, Cerón M, Salas A, Gonzales A, Sandoval N, Rivera H, Rosadio R. 1998.** Evidencia serológica del virus de la enfermedad de Aujeszky (Pseudorabia) en porcinos. *Rev Inv Pec* 9(1): 38-43.
38. **MacLachlan J y Dubovi E. 2011.** Fenner's Veterinary Virology. 4^a ed. El Sevier. 499p.

39. **McCaw MB, Osorio FA, Wheeler J, Xu J, Erickson GA. 1997.** Effect of maternally acquired Aujeszky's disease (pseudorabies) virus-specific antibody in pigs on establishment of latency and seroconversion to differential glycoproteins after low dose challenge. *Vet microbiol.* 55(1): 91-98.
40. **McCullough SJ, Todd D. 1988.** Subclinical Aujeszky's disease virus infection in a pig herd and the characterization of the strain of virus isolated. *Vet Rec* 122(4):77-81.
41. **Mettenleiter TC. 1994.** Pseudorabies virus (Aujeszky's disease): A brief introduction. En: OIE SYMPOSIUM, 1994. Bangkok: Organización Mundial de Sanidad Animal
42. **Mettenleiter T. 1996.** Immunobiology of pseudorabies (Aujeszky's disease). *Vet immunology and immunopathology* 54(1): 221-229.
43. **Mettenleiter TC. 2000.** Aujeszky's disease (pseudorabies) virus: the virus and molecular pathogenesis – State of the art, June 1999. *Vet Res* 31(1): 99-115.
44. **Moennig V, Woldesenbert P, Fey HR, Liess B, Dopotka HD, Behrens F. 1982.** Comparative evaluation of ELISA and neutralization test for the diagnosis of Aujeszky's disease. En: Wittmann G y Hall SA, eds. *Aujeszky's Disease*. Springer Netherlands 7: 51-56.
45. **Morilla AG. 1996.** Control y Erradicación de la Enfermedad de Aujeszky. *Cienc Vet* 7: 241-271.
46. **Müller T, Hahn EC, Tottewitz F, Kramer M, Klupp BG, Mettenleiter TC, Freuling C. 2011.** Pseudorabies virus in wild swine a global perspective. *Arch Virol* 156(10): 1691-1705.
47. **Nauwynck H, Glorieux S, Favoreel H, Pensaert M. 2007.** Cell biological and molecular characteristics of pseudorabies virus infections in cell cultures and pigs with emphasis on the respiratory tract. *Vet Res* 38(2): 229-241.
48. **Nauwynck HJ. 1997.** Functional aspect of Aujeszky's disease (pseudorabies) viral proteins with relation to invasion, virulence and immunogenicity. *Vet Microbiol* 55(1): 3-11.

49. **Ober BT, Teufel B, Wiesmuller KH, Jung G, Pfaff E, Saalmuller A, Rziha HJ. 2000.** The porcine humoral immune response against Pseudorabies virus specifically targets attachment sites on glycoprotein gC. *J Virol* 74(4): 1752-1760.
50. **[OIE] Organización mundial de salud animal. 2005.** [Internet] [7 noviembre 2014]. Disponible en: ftp://ftp.oie.int/infos_san_archives/esp/2005/es_050708v18n27.pdf.
51. **[OIE] Organización Mundial de Sanidad Animal. 2012.** Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres. 7ª ed. McGraw Hill. 1404 p.
52. **Papageorgiou KV, Burriel AR., Filioussis G, Psychas V, Nauwynck HJ, Kritas, SK. 2011.** Aujeszky's Disease (Pseudorabies). An old threat in current pig industry? Part I. Pathogenetic information and implications. *J Hellen Vet Med Soc* 62(1): 29-37.
53. **Pejsak ZK, Truszczyński MJ. 2006.** Pseudorabies (Aujeszky's Disease). En: Leman AD, Straw BE, Mengeling WL, D'allaire S, Taylor DJ, eds. *Diseases of swine*. 9na ed. USA: Blackwell. p 419-433.
54. **Perfumo CJ, Petruccelli MA, Massone A, Herrero MA, Echeverría G. 2010.** Neumonía en cerdos de engorde: lesiones producidas por la interacción de *Actinobacillus pleuropneumoniae* y el virus de la enfermedad de Aujeszky. *Av Cienc Vet* 8(1): 1-4.
55. **Perng GC, Jones CJ, Ciacci-Zanella J, Stone M, Henderson GA, Yukht A, Slanina SM, Hofman FM, Ghiasi H, Nesburn AB, Wechsler SL. 2000.** Virus-induced neuronal apoptosis blocked by the herpes simplex virus latency-associated transcript. *Vet Bio Sci* 287: 1500-1503.
56. **Pomeranz L, Reynolds A, Hengartner C, 2005.** Molecular Biology of Pseudorabies Virus: Impact on Neurovirology and Veterinary Medicine. *Microbiol Mol Biol Rev* 69(3): 462 – 500.
57. **Portal Agrario. 2013.** Lima: Ministerio de Agricultura. [Internet], [12 octubre 2014]. Disponible en: <http://www.minag.gob.pe/>
58. **Rock DL, Hagemoser WA, Osorio FA, McAllister HA. 1987.** Transcription from the pseudorabies virus genome latent infection. *Arch of Virol*. 98 (1-2): 99 – 106.

59. **Rodak L, Smid B, Valicek L, Jurak E. 1987.** Four layer enzyme immunoassay (EIA) detection of differences in IgG, IgM and IgA antibody response to Aujeszky's Disease virus in infected and vaccinated pigs. *Vet Microbiol* 13(2): 121-133.
60. **Romero CH, Meade PN, Homer BL, Shultz JE, Lollis, G. 2003.** Potential sites of virus latency associated with indigenous pseudorabies viruses in feral swine. *Journal of wildlife diseases* 39(3): 567-575.
61. **Rziha HJ, Mettenleiter T, Ohlinger V, Wittmann G. 1985.** Herpesvirus (pseudorabies virus) latency in swine: Occurrence and physical state of DNA in neural tissues. *Virology* 155(2): 600-613.
62. **Salas A. 1997.** Detección de anticuerpos contra Pseudorabia en marranas de crianza no tecnificada del valle de Lima. Tesis de Médico Veterinario Lima: Univ. Nac Mayor de San Marcos. 37 p.
63. **Sánchez-Vizcaino JM. 2004.** Curso de introducción a la inmunología porcina. [Internet] [08 de Agosto 2014]. 2º Edición. Disponible en: <http://www.sanidadanimal.info/cursos/inmuno2/ca013.htm>
64. **Schoenbaum MA, Beran GW, Murphy DP. 1990.** A study comparing the immunologic responses of swine to pseudorabies viral antigens based on the ELISA, serum virus neutralization, and latex agglutination tests. *J Vet Diag Inv* 2(1): 29-34
65. **Schulz K, Liu X, Klupp B, Granzow H, Cohen J, Mettenleiter T. 2014.** Pseudorabies Virus pUL46 induces activation of ERK1/2 and regulates herpesvirus induced nuclear envelope breakdown. *J Virol* 88(11): 6033-6011.
66. **Sen GC. 2001.** Viruses and interferons. *Annu Rev Microbiol* 55(1): 255-281.
67. **Shukla D, Spear PG. 2001.** Herpesviruses and heparan sulfate: an intimate relationship and axis of viral entry. *J Clin Invest* 108(4): 503-510.
68. **Tanaka S, Mannen K. 2014.** Analysis of the Mechanism of Reactivation of Latently Infected Pseudorabies Virus by Acetylcholine. *J Vet Med Science* 76(5): 719-722.
69. **Tombácz D, Tóth JS, Boldogkoi Z. 2012.** Effects of deletion of the early protein 0 gene of pseudorabies virus on the overall viral gene expression. *Gene* 493(2): 235-242.

70. **Tóth JS, Tombácz D, Takács IF, Boldogkoi Z. 2010.** The effects of viral load on pseudorabies virus gene expression. *BMC Microb* 10: 311.
71. **Wittmann G. 1985.** La enfermedad de Aujeszky. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 4(1): 995-1009.
72. **Yong T, Huan-Chun C, Shao-Bo X, Ya-Li Q, Qi-Gai H, Yu-Qi R. 2005.** Development of a latex agglutination test using the major epitope domain of glycoprotein E of pseudorabies virus expressed in *E. coli* to differentiate between immune responses in pigs naturally infected or vaccinated with pseudorabies virus. *Vet Res Commun* 29(6): 487-497.
73. **Zuckermann FA. 2000.** Aujeszky's disease virus: oportunities and challenges. *Vet Res* 31(1): 121-131.